Aus der Medizinischen Klinik der Universität Innsbruck
Direktor: Prof. Dr. med. H. Braunsteiner
und
Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität Würzburg
Direktor: Prof. Dr. med. H. Franke

Altersabhängige Veränderungen der Plasmaphospholipide beim Menschen

Inaugural-Dissertation

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von
Marita Heller
aus Lüdenscheid

Würzburg 1967

Aus der Medizinischen Klinik der Universität Innsbruck
Direktor: Prof. Dr. med. H. Braunsteiner
und
Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität Würzburg
Direktor: Prof. Dr. med. H. Franke

Altersabhängige Veränderungen der Plasmaphospholipide beim Menschen

Inaugural-Dissertation

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von
Marita Heller
aus Lüdenscheid

Würzburg 1967

Referent: Professor Dr. med. H. B r a u n s t e i n e r

Korreferent: Professor Dr. med. H. F r a n k e

Tag der Promotion:

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Würzburg

Einleitung:

Erst mit der Entwicklung der Papier- und Dünnschichtchromatographie ist eine genauere quantitative Untersuchung der einzelnen Phospholipidfraktionen möglich geworden.
Lea et al. in England (1955) (1) und Marinetti's Gruppe in USA (1956) (2) führten die Papierchromatographie auf Kieselgel imprägnierten Papier durch. Die Technik der Dünnschichtchromatographie entwickelte hauptsächlich Stahl et al. (1960) (3). In der Folgezeit untersuchte Phillips (1960) (4) säulenchromatographisch die Verteilung der Lipide im Serum und auch Billimoria (1965) (5) wandte diese Methode auf die Plasmalipide an. Alle anderen Autoren bevorzugten die Dünnschichtchromatographie. Als Extraktionsmethode wurde meistens diejenige nach Folch (6) bzw. eine modifizierte nach Carlson (7)

angewandt. Um die Chromatogramme zu entwickeln, diente allen ein Gemisch aus Chloroform, Methanol und Wasser. Christian (8) fügte noch Essigsäure hinzu, wodurch er die Polarität des Laufmittels erhöhen konnte. Die Phosphorbestimmung erfolgte meistens nach der von Bartlett (9) angegebenen Methode.

Bisher liegen Untersuchungen über die Verteilung der einzelnen Plasma-Phospholipidfraktionen bei verschiedenen Krankheiten z.B. Lebererkrankungen, essentielle Hyperlipämie, multiple Sklerose usw. vor. Die Werte dieser Patienten wurden mit jenen von Normalpersonen verglichen ohne genaue Berücksichtigung des Alters (s. Tabelle 5).
Es ist bekannt, daß junge Leute einen niedrigeren Totalcholesterinspiegel haben und daß ältere Frauen einen wesentlich höheren als Männer zeigen. Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist zu prüfen, ob eine Altersabhängigkeit oder ob Geschlechtsunterschiede in der Verteilung der Plasma-Phospholipide vorliegen. Plasma von je fünf Männern und Frauen in drei Altersstufen wurde untersucht:

Gruppe I 18 - 26 Jahre
Gruppe II 39 - 54 Jahre
Gruppe III 56 - 85 Jahre

In der vorliegenden Untersuchung gelang es nun auf ähnliche Weise wie Christian (1964) (8) und Dienstl (1966) (1o)

dünnschichtchromatographisch sechs Einzelfraktionen aufzutrennen: Lysolecithin (LL), Sphingomyelin (SP), Lecithin (LE), Phosphatidylinositol (PI), Phosphatidyläthanolamin (PE) und "Phosphatidsäuren" (PA).

Die Werte dieser sechs Fraktionen untersuchten wir bei Normalpersonen. Als Normalpersonen galten für diese Untersuchung stationäre Patienten der Medizinischen Klinik, bei welchen Krankheiten mit Veränderungen des Fettstoffwechsels ausgeschlossen werden konnten. (Diabetes, Hyper-, Hypothyreose, starke Adipositas, Lebererkrankung, Cushing-Syndrom, Myokardinfarkt, Thrombotische Erkrankungen, Graviditas, Hyperlipämie)

M e t h o d e :

3o Personen wurde nüchtern mit einer dicken Kanüle Venenblut abgenommen, das man direkt in ein Röhrchen tropfen ließ, in dem sich 2 - 3 Tropfen Heparin-Novo (Novo Industri A/S, Kopenhagen) befanden, 1o Minuten bei 4°C und 3ooo upm. zentrifugiert und das überstehende Plasma sofort weiterverarbeitet.

Extraktion:

Die Extraktion von 2 ml Plasma erfolgte nach Folch (6). Bei dieser Methode haben wir auf das Waschen mit der "upper pha se" (o.29 % pS : M : Cl = 47 : 48 : 3) verzichtet, da ein quantitativer Vergleich desselben Plasmas mit und ohne (d. h. es ist nur mit o,73 %iger NaCl-Lösung gewaschen worden) "upper phase" keine nennenswerten Unterschiede ergab.

Die untere lipidhältige Phase des Extraktes wurde nach ca. 24 Stunden unter Stickstoff im Rotavapor bei ungefähr 4o°C verdampft. Der Rückstand wurde in Chloroform gelöst und in graduierten Eprouvetten neuerlich auf 1 ml Extrakt unter Stickstoff bei Zimmertemperatur eingeengt.

Dünnschichtchromatographie:

2o x 2o cm und 1o x 2o cm große Glasplatten wurden mit einer

Masse von 1 Teil Kieselgel G (Merck) und 2 Teilen 1 mM Na_2CO_3-Lösung etwa 300 µ dick beschichtet, luftgetrocknet und vor dem Experiment bei 110°C 1 Stunde lang aktiviert. Mit einer AGLA -Mikrospritze wurden 40 µl des in Chloroform gelösten Extraktes bandförmig (ca. 1 cm breit), ungefähr 1 cm vom unteren Kieselgelrand entfernt, aufgetragen. Die Trennung erfolgte in gesättigter Kammer und bei Zimmertemperatur in einem nach Skipski (11) modifizierten Laufmittel (Chloroform : Methanol : Essigsäure : Aqua dest. = 100 : 60 : 14 : 7). Das Laufmittel stieg 15 cm hoch. Die durchschnittliche Laufzeit betrug 1 Stunde. Oberhalb der Laufmittelfront wurden zwei Mal je 40 µl Extrakt aufgetragen, jedoch nicht chromatographisch getrennt.

Vorversuche:

Ein Vorwaschen der mit Kieselgel G beschichteten Platten mit einem Gemisch aus Chloroform : Methanol : Ameisensäure /- 120 : 30 : 2, wobei die Platten 12 Stunden in eine mit diesem Gemisch gesättigte Kammer gerade eintauchten, verminderte den Kieselgel-Leerwert bei der Phosphorbestimmung nicht. (12)

Die Trennung der einzelnen Phospholipidfraktionen war auf Platten mit Kieselgel H (Merck) nicht so gut. Allerdings lag hier der Leerwert bei den über Nacht vorgewaschenen Platten bedeutend niedriger (Tabelle 1). Aber beim Entwickeln der Chromatogramme wanderten die einzelnen Fraktionen ziemlich

	E
Kieselgel H Platten nicht vorgewaschen	35
Kieselgel H Platten vorgewaschen	2o
Kieselgel G Platten nicht vorgewaschen	56,5
Kieselgel G Platten vorgewaschen	55

Tabelle 1: Kieselgel-Leerwerte (E) von chromatographierten Platten, abgelesen am Eppendorf-Photometer bei 578mμ. Näheres siehe Text

schnell, so daß eine genaue Abgrenzung besonders zwischen PE und PA nicht möglich war. Das beeinträchtigte natürlich die Phosphorbestimmung.

Wenn man das Laufmittel veränderte und zwar das Verhältnis Essigsäure : Aqua dest. (z.B. Chloroform : Methanol : Essigsäure : Aqua dest. = 1oo : 6o : 12 : 6), dann erhielt man keine Trennung zwischen LL und SP. Bei der Zusammensetzung genau nach Skipski (11) (Chloroform : Methanol : Essigsäure : Aqua dest. = 1oo : 6o : 16 : 8) wanderten LL, SP und LE so weit hinauf, daß man keine ausreichende Trennung zwischen PI, PE und PA erzielte.

Auch das punktförmige Auftragen des Extraktes verhinderte eine gut abgrenzbare Trennung. Diese war auf Kieselgel G Platten am besten, wenn man den Extrakt bandförmig, möglichst ohne die Kieselgelschicht mit der Nadelspitze zu beschädigen, auftrug. Kieselgel G -Platten haben nur den Nachteil, daß

der Leerwert um ca. 6o % höher liegt als bei den vorgewaschenen Kieselgel H -Platten. Trotzdem wurden die Untersuchungen auf Kieselgel G -Platten durchgeführt, wobei die Laufmittelzusammensetzung Chloroform : Methanol : Essigsäure : Aqua dest. = 1oo : 6o : 14 : 7 gewählt wurde.

Anfärbung der getrennten Phospholipide:

Bei Raumtemperatur trockneten die Platten mindestens eine Stunde lang. Dann wurden sie unter Joddampf gelegt. Dabei färbten sich die Einzelfraktionen bräunlich an und man konnte sie mit einer Nadel markieren. Nun ließ man das Jod möglichst vollständig verdampfen, bevor man die einzelnen Abschnitte mit einer Rasierklinge vorsichtig abkratzte und in Zentrifugengläser füllte. Ebenso wurden mit dem nicht aufgetrennten 4o µl Extrakt verfahren. Außerdem wurden gleich große leere Plattenabschnitte abgekratzt und das Kieselgel als Leerwert (Blank) und als Zusatz zum Standard (1o µg Phosphor / 1 ml) weiterverarbeitet. Von jeder Fraktion wurden Doppelbestimmungen gemacht.

Phosphorbestimmung:

Diese erfolgte nach Bartlett (9). Die Lecithinfraktion und die nicht aufgetrennte 4o µl Vergleichsmenge wurden mit der dreifachen Reagenzienmenge angesetzt, da mit mehr als 5 µg

Phosphor zu rechnen war. Der Phosphorgehalt der nicht aufgetrennten Extraktmenge wurde mit der Summe der Einzelfraktionen verglichen. Es ergaben sich für die Summe der Einzelfraktionen (Recovery) Werte von 92 - 109 % des nicht aufgetrennten 40 µl Extraktes. Die Extinktion wurde am Beckman-Spektralphotometer Modell DU B bei der Wellenlänge 830 mµ abgelesen.
Bei den Vorversuchen wurde aus technischen Gründen mit dem Eppendorf-Photometer bei 578 mµ photometriert.

Identifizierung:

Die Identifizierung der einzelnen Fraktionen erfolgte mit gereinigten Vergleichssubstanzen und durch Anfärbung mit Nachweisreagenzien.
Die Vergleichssubstanzen wurden wie der Extrakt aufgetragen und ebenso chromatographisch entwickelt.
LL ex egg lecithin Butch Nr. 13558
SP ex beef brain " Nr. 11544
PS ex beef brain " Nr. 18008
(Testsubstanzen von Koch-Light-Lab.Ltd. Colnbrock Buchs England)
PI wurde freundlicherweise von Dr. Forné, Institute Pasteur (Paris), zur Verfügung gestellt.

Die mit den Neutralfetten rasch wandernde, sehr wenig Phosphor enthaltende Fraktion wurde in Anlehnung der Terminologie nach Skidmore und Entenmann (1962) (13) als "Phosphatidsäuren"

bezeichnet. Es ist noch unsicher, ob in dieser Fraktion tatsächlich nur Phosphatidsäuren oder auch andere Phosphatide enthalten sind.

Mit Ninhydrin reagieren jene Phospholipide positiv, die freie Aminogruppen enthalten, also PE und PS. Dragendorf Reagens nach Skidmore und Entenmann (13) erzeugt eine orange-farbene Tönung bei Verbindungen, die Cholin enthalten. (Tabelle 2)

	LL	SP	LE	PI	PE	PA
Ninhydrin	-	-	-	-	+	-
Dragendorf	+	+	+	-	-	-

Die Fraktion über dem LE zeigte keine Reaktion mit Ninhydrin und Dragendorf-Reagens. Diese hatte aber einen ähnlichen R_F-Wert, wie das von Skipski (11) angegebene PI.

Es konnte nur ein einziger deutlich positiver Ninhydrin Abschnitt nachgewiesen werden, nämlich PE (R_F-Wert ähnlich wie bei Skipski (11)). Phosphatidylserin wurde bisher chromatographisch im Plasma nicht nachgewiesen. Es besteht die Möglichkeit, daß es bei diesem Laufmittel mit PE gewandert ist, oder daß die Konzentration so niedrig ist, daß kein gesicherter Abschnitt nachweisbar war. Wenn man aber die mit Ninhydrin besprühte Platte längere Zeit im Brutschrank ließ, so nahm der PI - Abschnitt eine ganz schwach rötliche Färbung an. Man

kann also nicht sicher entscheiden, ob bei diesem Laufmittel das PS mit dem PI oder mit dem PE gewandert ist.

Die statistische Berechnung erfolgte nach Fisher (14). Die Irrtumswahrscheinlichkeit p wurde der Tabelle für t aus Fisher und Yates (15) entnommen.

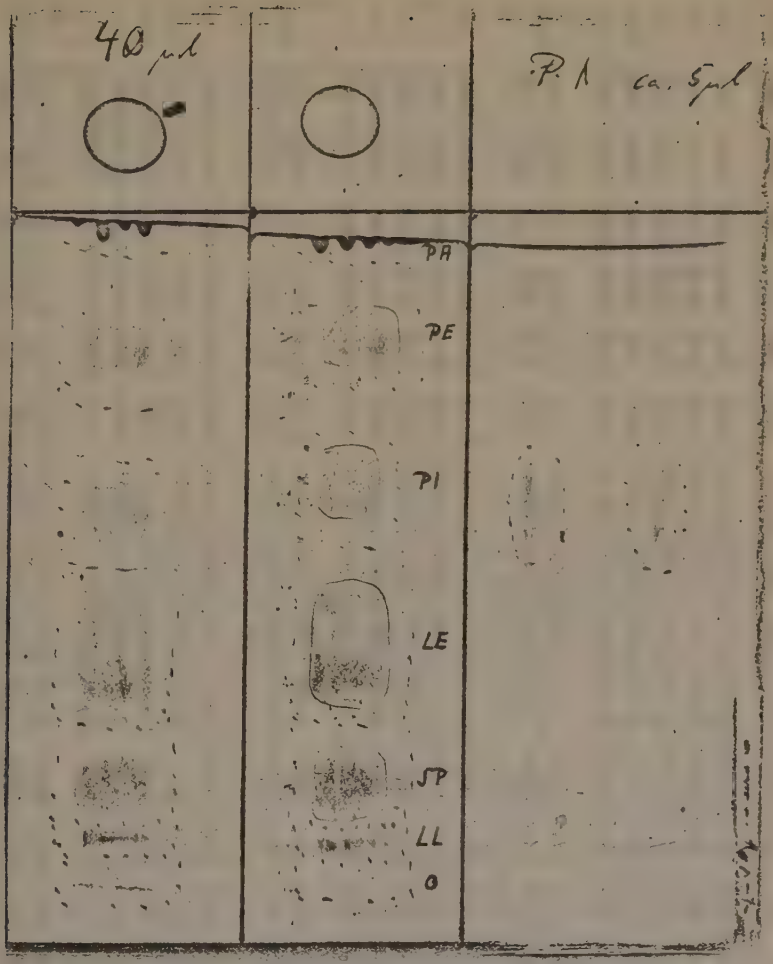

Abbildung 1: Dünnschichtchromatographie von Plasma-Phospholipiden auf Kieselgel G. Laufmittel: Chloroform : Methanol : Essigsäure : Aquadest. = 100 : 60 : 14 : 7. Einzelfraktionen wurden mit Joddampf sichtbar gemacht
links: Extrakt aus dem Plasma einer Normal-Patientin
rechts: Testlauf mit gereinigtem Phosphatidylinositol (PI)

	Alter	% des Gesamtlipid-Phosphor (T-P)							ug Phosphor/ ml Plasma						
		O.	LL	SP	LE	PI	PE	PA	T-P	O.	LL	SP	LE	PI	PE	PA
W.S.	21	o,59	5,8o	16,5	62,o	4,3o	9,2o	1,85	87,9	o,52	5,o7	15,o	54,o	3,75	8,1o	1,62
Z.M.	25	1,o6	5,32	22,4	55,o	5,32	7,95	2,6o	51,6	o,55	2,75	11,4	28,8	2,75	4,o5	1,33
G.M.	18	o,75	5,18	16,2	63,5	5,oo	6,4o	2,8o	79,o	o,59	4,1o	12,9	5o,2	3,95	5,o5	2,23
S.H.	24	o,81	6,58	13,6	57,1	9,4o	9,9o	2,33	58,9	o,47	3,87	8,2	33,6	5,53	5,85	1,37
G.W.	21	o,84	5,58	2o,8	53,2	7,35	1o,o2	2,o2	53,3	o,44	2,94	11,o	28,2	3,86	5,3o	1,6o
$\bar{x}$	23	o,81	5,68	17,9	58,1	6,25	8,71	2,32	66,2	o,51	3,75	11,7	39,o	3,97	5,67	1,63
s	2,8	o,16	o,55	3,6	4,4	2,o1	1,52	o,39	16,4	o,16	1,72	3,3	12,3	1,22	1,51	o,36
B.B.	39	o,42	5,3o	16,4	64,2	4,o5	7,oo	2,35	71,3	o,3o	3,8o	11,7	46,o	2,87	5,oo	1,68
B.E.	51	o,79	4,12	2o,2	6o,3	5,92	7,11	1,34	81,o	o,64	3,33	16,4	49,o	4,8o	5,75	1,o9
P.F.	44	o,69	5,o1	18,8	61,o	5,2o	6,3o	2,17	69,o	o,55	3,96	14,9	38,8	4,1o	5,oo	1,7o
M.M.	5o	o,68	5,32	17,4	57,2	7,75	9,7o	1,64	65,o	o,44	3,45	11,3	37,o	5,oo	6,25	1,6o
G.A.	43	o,88	5,1o	16,4	62,2	6,28	7,8o	1,64	9o,6	o,31	4,6o	14,9	56,5	5,6o	7,15	1,5o
$\bar{x}$	45	o,69	4,97	17,8	6o,1	5,84	7,58	1,83	75,4	o,45	3,83	13,8	45,5	4,47	5,83	1,51
s	5,o	o,16	o,47	1,6	2,5	1,4o	1,3o	o,42	1o,3	o,2o	o,5o	2,2	7,9	1,o4	o,91	o,25
N.J.	56	o,91	4,o5	2o,7	61,2	5,48	6,72	1,1o	8o,6	o,72	3,2o	16,2	49,8	4,45	5,4o	o,87
M.H.	79	o,42	3,2o	16,2	61,o	6,52	1o,oo	2,1o	78,6	o,34	2,65	13,o	49,2	5,3o	6,4o	1,68
M.F.	62	o,48	3,o3	16,o	61,2	7,1o	1o,4o	1,9o	75,9	1,o1	2,o8	11,o	48,5	4,82	7,15	1,31
K.E.	58	o,53	3,5o	14,6	67,2	4,55	7,9o	1,37	59,4	o,31	2,1o	8,7	4o,o	2,72	4,75	o,82
P.C.	57	o,95	3,64	17,1	63,9	6,35	6,62	1,42	66,1	o,62	3,oo	11,9	41,1	4,17	4,38	o,94
$\bar{x}$	62	o,66	3,64	17,1	62,9	6,oo	8,33	1,58	72,1	o,6o	2,61	12,2	45,7	4,29	5,62	1,12
s	9,5	o,25	o,58	2,3	2,6	o,99	1,9o	o,41	11,o	o,28	o,51	3,6	4,8	o,98	1,15	o,36

Tabelle 3: Heparin-Plasma-Phospholipidfraktionen von 15 normalen Frauen der drei Altersgruppen: Gruppe I = 18-25, Gruppe II = 39-50, Gruppe III = 56-79 Jahre . O.= Ursprung= Auftragzone.

	Alter	% des Gesamtlipid-Phosphor (T-P)							ug Phosphor/ ml Plasma						
		O.	LL	SP	LE	PI	PE	PA	T-P	O.	LL	SP	LE	PI	PE	PA
E.W.	24	o,49	4,5o	16,3	66,o	5,o5	6,o9	1,68	54,4	o,29	2,44	8,9	35,8	2,74	3,34	o,91
L.K.	25	o,oo	5,75	14,1	58,o	8,6o	11,oo	2,1o	58,3	o,oo	3,3o	8,5	33,8	5,18	6,35	1,21
L.S.	26	o,63	5,9o	19,8	63,4	2,48	6,35	1,41	72,1	o,42	3,86	14,3	46,5	1,79	4,17	1,o5
G.R.	24	1,11	6,7o	17,3	54,8	7,8o	8,95	3,35	54,5	o,61	3,96	9,5	29,2	4,27	5,19	1,83
R.G.	25	o,6o	7,29	15,4	61,o	6,oo	7,7o	1,88	71,2	o,43	5,18	11,o	43,5	4,27	5,5o	1,34
$\bar{x}$	25	o,57	6,o3	16,6	6o,6	5,99	8,o3	2,o8	62,1	o,35	3,75	1o,4	37,8	3,65	4,91	1,27
s	o,9	o,4o	1,o6	2,1	4,4	2,41	2,oo	o,75	8,4	o,22	1,oo	2,4	6,7	1,36	1,17	o,35
S.K.	46	o,58	4,38	17,8	59,1	7,17	1o,4o	1,1o	83,4	o,49	3,7o	15,o	48,5	6,o4	8,8o	o,92
V.F.	43	o,52	6,35	14,8	65,2	4,75	6,o2	1,62	88,3	o,46	5,6o	13,1	58,2	4,19	5,34	1,43
H.P.	4o	o,49	4,59	15,9	66,5	5,3o	5,62	1,55	77,1	o,38	3,54	12,2	51,4	4,o7	4,35	1,2o
T.J.	52	o,87	4,35	15,7	6o,o	8,22	9,3o	1,74	71,8	o,62	3,15	11,2	43,o	5,94	6,7o	1,25
Z.J.	54	o,47	4,75	17,o	65,3	4,9	5,8o	1,5o	93,9	o,45	4,5o	16,o	61,5	4,61	5,45	1,41
$\bar{x}$	47	o,59	4,89	16,3	63,2	6,o7	7,43	1,5o	82,9	o,48	4,1o	13,5	52,5	4,97	6,13	1,24
s	5,9	o,15	o,83	1,2	3,4	1,55	2,25	o,24	8,7	o,o7	o,97	2,oo	7,4	o,95	1,71	o,2o
L.K.	61	o,94	4,87	22,6	55,2	6,4o	8,48	1,6o	71,1	o,68	3,5o	16,2	39,o	4,52	6,o7	1,o9
L.R.	56	o,48	3,82	17,4	66,8	4,65	6,o5	o,84	92,1	o,45	3,52	16,o	61,5	4,3o	5,57	o,77
S.A.	58	o,51	4,54	17,6	63,6	5,82	7,68	1,24	92,4	o,47	4,2o	16,3	57,8	5,4o	7,1o	1,15
G.J.	6o	o,16	3,78	18,5	61,2	5,21	9,65	1,21	85,4	o,14	3,22	15,8	52,5	4,46	8,24	1,o3
H.P.	85	o,32	4,3o	21,8	61,1	4,1o	6,43	1,62	61,3	o,2o	2,66	13,7	38,o	2,52	3,2o	1,oo
$\bar{x}$	64	o,48	4,26	19,6	61,6	5,23	7,66	1,3o	8o,5	o,39	3,42	15,6	49,8	4,24	6,o4	1,o1
s	11,9	o,34	o,47	2,4	4,3	o,91	1,48	o,32	13,7	o,22	o,55	1,1	1o,8	1,o5	1,89	o,14

Tabelle 4: Heparin-Plasma-Phospholipidfrkationen von 15 normalen Männern der drei Altersgruppen: Gruppe I = 24-26 , Gruppe II = 40-54, Gruppe III = 56-85 Jahre . O. = Ursprung= Auftragzone

Ergebnisse:

Abbildung 1 zeigt die dünnschichtchromatographische Trennung der Phospholipide. Die Trennung der einzelnen Fraktionen erwies sich als ausreichend für die folgende quantitative Bestimmung.

Die Versuchswerte in den Tabellen 3 und 4 stellen die prozentuellen und absoluten Werte der einzelnen Phospholipide im menschlichen Heparin-Plasma von je 15 Frauen und Männern der drei Altersgruppen dar. (Gruppe I: 18 - 26 Jahre, Gruppe II: 39 - 54 Jahre, Gruppe III: 56 - 85 Jahre) Am Ende jeder Gruppe sind die Durchschnittswerte ($\bar{x}$) und die Standardabweichung (s) angegeben. Die Ausbeute der Einzelfraktionswerte ergab 92 - 1o9 % des nicht aufgetrennten Extraktes (recovery).
Die Werte der Einzelfraktionen sind in Prozent des Gesamtphosphors angegeben.

Zwischen Männern und Frauen bestehen in den entsprechenden Altersgruppen kaum Unterschiede. Nur bei LL ergab sich in der Altersgruppe III ein signifikanter Unterschied. Die relativen LL-Werte sind bei Frauen der Gruppe III signifikant ($p < o,o1$) gegenüber den Männern III erniedrigt.

In der Altersgruppe II ist der Gesamt-Lipid-Phosphor am höchsten und zwar signifikant erhöht gegenüber der Gruppe I

$p < 0{,}01$)- Es besteht auch ein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe I und III ($p < 0{,}01$). Jugendliche zeigen also den niedrigsten Phospholipidgehalt. Einen signifkanten Unterschied zwischen der Gruppe II und III konnte man nicht nachweisen.

Bei den Prozentwerten der einzelnen Fraktionen wurde bei LL eine signifikante Abnahme von Altersgruppe I bis III festgestellt. Hier unterscheiden sich die Männer und Frauen ein wenig. Bei den Männern ist der Abfall im Alter nicht so deutlich. Infolge des erhöhten Phospholipidspiegels im Alter ließ sich bei den Absolutwerten nur eine geringe Abnahme im Alter nachweisen. Im einzelnen verhält sich die LL-Fraktion wie folgt.

Frauen: relativ (r.) absolut (a.)

	Gruppe I	: Gruppe II	$p < 0{,}05$	
r.:	5,68 %	4,97 %		
a.:	3,75 ug P/ml Pl.	3,83 ug P		
	Gruppe I	: Gruppe III	$p < 0{,}001$	$p < 0{,}1$
r.:		3,64 %		
a.:		2,61 ug P		
	Gruppe II	: Gruppe III	$p < 0{,}01$	$p < 0{,}05$

Männer:

	Gruppe I	: Gruppe III	$p < 0{,}01$
r.:	6,03 %	4,26 %	
a.:	3,75 ug P/ml Pl.	3,42 ug P	

Bei der SP -Fraktion erwies sich nur bei den Männern im Alter eine signifikante Zunahme, bei den relativen Werten nicht ganz

so deutlich wie bei den absoluten.

		relativ (r.)	absolut (a.)
Gruppe I	: Gruppe II		$p < 0{,}05$
r.: 16,6 %	16,3 %		
a.: 1o,4 ug P/ml Pl.	13,5 ug P		
Gruppe I	: Gruppe III		$p < 0{,}05$
r.:	19,6 %		
a.:	15,6 ug P		
Gruppe II	: Gruppe III	$p < 0{,}05$	$p < 0{,}05$

Die Fraktionen LE, PI und PE zeigten keine Alters- und Geschlechtsunterschiede.

Aber die kleine Fraktion der "Phosphatidsäuren" wies trotz des geringen Phosphorgehaltes bei großer Streuungsbreite eine, wenn auch nur geringe signifikante Abnahme im Alter auf. Der Unterschied tritt bei den Frauen etwas deutlicher hervor als bei den Männern.

Frauen:		relativ	t	absolut	t
Gruppe I	: Gruppe II	$p<0{,}1$	1,92		o,62
r.: 2,32 %	1,83 %				
a.: 1,63 ug P	1,51 ug P				
Gruppe I	: Gruppe III	$p<0{,}02$	2,92	$p<0{,}05$	2,23
r.:	1,58 %				
a.:	1,12 ug P				
Gruppe II	: Gruppe III		o,96	$p<0{,}1$	1,98

Männer:

Männer:		relativ	t	absolut	t
Gruppe I	: Gruppe III	$p < 0,1$	2,12		1,57
r.: 2,08 %	1,3 %				
a.: 1,27 ug P	1,01 ug P				
Gruppe II	: Gruppe III		1,13	$p < 0,1$	2,14
r.: 1,5 %					
a.: 1,24 ug P					

Autor	n	Alter	LL	SP	LE	PI	PE	PA
Marinetti (1959) papierchromat.	2	35	9,6	2o,6	67,5	-	2,6	-
Phillips (196o) säulenchromat.	15		7,7	19,o	68,2	-	5,o	-
Nye (1961) papierschromat.	6		6,6	2o,1	71,2	-	-	-
Habermann (1961) dünnschichtchr.			14,3	9,2 7,9	63,8	-	4,3	-
Robinson (1963) dünnschichtchr.	3		12,9	18,9	65,1	-	4,4	-
Wagener (1964) dünnschichtchr.	2o	26	9,4	21,5	66,o	-	3,o	-
Vikrot (1964) dünnschichtchr.	9	22	5,9	21,2	69,9	-	3,o	-
Biezenski (1964) dünnschichtchr.			o,5	16,6	7o,6	2,5	-	3,2
Christian (1964) dünnschichtchr.	1o	3-7	5,2	17,5	68,8	2,5	4,3	1,7
Billimoria (1965) säulenchromat.	12	47	1,8	17,5	72,5	-	8,1	-
Billimoria (1965) dünnschichtchr.			12	21	59	-	7	-
Gjone (1965) dünnschichtchr.	16	28	5,4	17,3	72,8	-	4,6	-
Gloster (1966) dünnschichtchr.	12	2o-8o	4,9	2o,7	7o,o	-	4,1	-
Montfoort (1966) dünnschichtchr.	17	18-66	1o,6	18,1	68,2	-	3,2	-
Dienstl (1966) dünnschichtchr.	8		3,o	2o,2	7o,o	2,6	3,8	o,7
Jeannet (1966) dünnschichtchr.	6	26,5	7,4	15,5	58,7	-	4,2	-
Zöllner (1966) dünnschichtchr.	3o		8,9	16,4	71,9	-	3,1	-

Tabelle 5: Bisherige Untersuchungen über die prozentuelle Verteilung der Plasma- bzw. Serum-Phospholipide bei Normalpersonen

n = Zahl der untersuchten Fälle

Diskussion:

In Tabelle 5 sind die Werte der einzelnen Plasmaphospholipoide von stoffwechselnormalen Personen zusammengestellt, die von anderen Autoren im Rahmen eines Krankheitsbildes als Vergleichswerte veröffentlicht wurden. Soweit die Anzahl der Untersuchten und deren Alter bekannt war, wurde dies angegeben.

Es treten nun teilweise erhebliche Unterschiede zu den vorliegenden Ergebnissen auf. Unsere Lecithinwerte (62 %) liegen an der unteren Grenze der bisher veröffentlichten, die PI-Werte liegen um ca. 3 % höher und die PE-Werte um o - 4 %.

A. Diskussion zur Methode:

Ursachen für die große Variationsbreite sind natürlich die unterschiedlichen Versuchsbedingungen, wie andere Trägermedien (Papier-, Säulen-, Dünnschichtchromatographie), Laufmittel und Extraktionsmethoden.

Marinetti (16) und Nye (17) untersuchten die Plasma-Phospholipide mittels Papierchromatographie. Mit dieser Methode können die Phospholipide nicht so scharf getrennt werden wie mit der Dünnschichtchromatographie.

Mit der Säulenchromatographie, die Phillips (4) und Billimoria (5) anwandten, ist bis jetzt keine reine Trennung erzielt worden. Die größte Schwierigkeit bereitet die Identifizierung der adsorbierten Substanzen. Besonders PI, PE und LE sind praktisch nicht zu trennen. Das zeigen auch die unterschiedlichen Ergebnisse von Phillips und Billimoria.

Habermann (18), Robinson (19), Wagener (2o), Vikrot (21), Billimoria (22), Gjone (23), Gloster (24), Montfoort (25), Jeannet (26) und Dienstl (1o) und Zöllner (27) verwendeten bei der Dünnschichtchromatographie ein Gemisch aus Chloroform, Methanol und Wasser. Mit diesem Laufmittel blieb nach unseren Untersuchungen das PI an oder in der Nähe des Ursprungs zurück. Bei eigenen Untersuchungen mit einer reinen Testsubstanz PI, wobei die Laufmittelzusammensetzung in Anlehnung nach Vikrot (21) Chloroform : Methanol : Aqua dest. = 8o : 25 : 4 gewählt wurde, blieb dieses in der Nähe des Ursprungs zurück.

Von den Autoren sind auch wenig Angaben über die Menge des Extraktes gemacht worden, die am Ursprung blieb. Mit Ausnahme von Wagener (2o) äußern sie sich nicht, ob sie diesen Abschnitt der Dünnschichtchromatographieplatten verworfen haben. In unserer Untersuchung wurde der Ursprung wie eine

Fraktion behandelt, genau so sorgfältig abgekratzt und photometrisch bestimmt. Diese Fraktion enthielt 0,3 - 1,5 % des Gesamtphosphors. Die Bestimmung dieser Zone ist besonders wichtig, wenn man obiges Laufmittel verwendet, da das PI leicht zurückbleibt.

Nur Christian (8) verwendete ein Laufmittel, dem er Essigsäure zusetzte. Seine Ergebnisse weichen dennoch von den vorliegenden ab. Er extrahierte zwar nach Folch (6), benutzte aber zum Waschen des Extraktes Wasser. In der Orginalarbeit nach Folch wird darauf hingewiesen, daß der Lipidverlust beim Waschen mit Wasser wesentlich höher ist als beim Waschen mit einer Salzlösung wie z. B. 0,73 %iger NaCl-Lösung, die wir nahmen. Bei Extrakten aus Leber, die am ehesten dem Plasma vergleichbar sind, beträgt der Lipidverlust beim Waschen mit Wasser an Stelle von 0,73 %iger NaCl-Lösung mindestens 3 - 6 %. Das macht im Gesamten nicht viel aus, kann aber für einzelne Fraktionen viel sein. Beim Plasma liegt der absolute Lipidverlust niedtiger, aber beträgt immerhin noch einige µg, was kleine Fraktionen wie LL, PI und PE entscheidend verändern kann.

Kaum ein Autor gibt an, wie hoch er die Laufmittelfront in der gesättigten Kammer steigen ließ. In unserer Untersuchung betrug die Höhe 15 cm. Verkürzte man die Laufstrecke, dann

konnte man LL und SP nicht genau trennen, aber auch zwischen PE und PA war eine Abgrenzung nur schwer möglich. Gerade bei einer Höhe von 15 cm war PE gut abgrenzbar.

PI ließ sich mit Jod schwer anfärben. Eine allzu große Sättigung mit Jod störte aber die Phosphorbestimmung. Deswegen wartete man immer so lange, bis sich LL, SP, LE, PE, und PA ausreichend abgezeichnet hatten, markierte dann diese Fraktionen und nahm als PI - Fraktion den Abschnitt der Schicht zwischen dem oberen Rand des LE und dem unteren Rand des PE. Dieser Abschnitt erwies sich immer als phosphorhältig. Wenn man den Joddampf länger auf die Platte einwirken ließ, dann zeichnete sich auch das PI als Fraktion ab. Diese Methode der Abgrenzung weist natürlich eine Fehlerquelle auf. Denn nun ist im Vergleich zu der Menge Kieselgel, die man als Leerwert nahm, viel Kieselgel in dem Röhrchen für die Phosphorbestimmung. Deswegen dürften die Ergebnisse für PI ein wenig hoch liegen.

Beim PE-Abschnitt ist diese Fehlerquelle auszuschließen, d.h. sie ist nicht höher als bei den anderen Fraktionen.

Notham (28) hat in seiner Arbeit über die Kephaline diese nach der von Axelrod (29) angegebenen Methode chemisch bestimmt. Nach Fällung des Plasmas in kolloidaler Eisenlösung werden die

aus dem Präcipitat extrahierten Phosphatide hydrolisiert und die Kephalinbasen Colamin und Serin nach Reaktion mit Dinitrofluorbenzol spektrophotometrisch bestimmt. Dabei erhielt Notham 2,5 % PE und 4,5 % PS. Die Summe entspricht etwa unserem Wert für PE. Nur ist es uns nicht gelungen, PS abzutrennen. Man kann nicht entscheiden, ob PS mit PE oder PI gewandert ist.

Außerdem war es mit diesem Laufmittel nicht möglich, das Cardiolipin zu trennen.

Unsere Lecithinwerte, die um 62 % liegen, sind niedriger als bei anderen Autoren. Der Grund hierfür wird darin zu finden sein, daß diese ein nicht so polares Laufmittel (nur Christian (8) setzte Essigsäure hinzu) verwendeten und weniger Einzelfraktionen auftrennen konnten.

B. Diskussion zu den Ergebnissen:

Wie auch von Braunsteiner und seinen Mitarbeitern (3o) berichtet, haben Jugendliche den niedrigsten Gesamtphospholipidgehalt im Plasma. Dieser nimmt bis zum 6. - 7. Dezennium zu und im hohen Lebensalter wieder etwas ab. In unserer Untersuchung hat der totale Phospholipidgehalt des Plasmas bei den Männern deutlicher, bei den Frauen weniger deutlich zugenommen. Am

auffälligsten war die Zunahme des SP bei den Männern ($p < 0{,}05$).

Das bemerkenswerteste Ergebnis dieser Untersuchung ist die signifikante Abnahme der relativen Lysolecithinwerte im Alter sowohl bei Männern als auch bei Frauen. Nur sind bei diesen in der Altersgruppe III die relativen Werte außerdem noch signifikant ($p < 0{,}01$) gegenüber den Männern III erniedrigt. Die Absolutwerte waren nur bei den Frauen im Alter (III♀) signifikant niedriger.

Auch andere Autoren, die die Phospholipide im Blutplasma bei bestimmten Krankheitsbildern untersucht haben, berichten von einer LL-Erniedrigung gegenüber ihren Normalwerten. Vikrot (21) stellt einen Anstieg der Gesamtphospholipide bei einer Abnahme des LL in der Schwangerschaft fest. Außerdem haben Marinetti et al. (16) beim Myokardinfarkt, Phillips (4) und Gjone (23) bei Lebererkrankungen, Jeannet (26) bei malignen Prozessen eine Senkung des LL beobachtet.

Für diese und unsere Ergebnisse kann man verschiedene Erklärungen annehmen. Einerseits wäre es möglich, daß der Abbau von Lecithin zu Lysolecithin, der durch die Phospholipase A bewirkt wird, im Alter weniger wirksam wäre. Die Phospholipase A spaltet als Carbonsäureesterase die Fettsäure in Stellung 2 (β) ab. Auf diese Weise kommen bekanntlich die Lysophosphatidylverbindungen zu Stande (31).

Andererseits könnte man sich auch vorstellen, daß der Abbau von LL im Alter stärker in Erscheinung tritt. Dieser Abbauweg ist auch tatsächlich schon beschrieben. Marples und Thompson (1960) (32) konnten im Ileum, Lunge, Milz, Leber, Pankreas und anderen tierischen Organen die Aktivität der Phospholipase B zeigen. Diese spaltet als Lysophospholipase an der jeweiligen Lyso-Verbindung die zweite Fettsäure ab und führt dadurch zum Cholin-Phosphatidylglycerol.

Eine weitere Erklärung für das niedrige Plasma-Lysolecithin wäre eine Abnahme der Lecithin-Cholesterin-Acyl-Transferase. Dieses Enzym überträgt eine Fettsäure (in Stellung 2) vom Lecithinmolekül auf freies Cholesterin. Dadurch entsteht einerseits LL und andererseits verschiebt sich das Verhältnis von freiem zu veresterten Cholesterin zugunsten des letzteren (Glomset, 1966) (33). Dieses Enzym wirkt besonders auf HDL (high-density-Lipoproteine), welche ein hohes LE/SP Verhältnis aufweisen.

Offensichtlich stellt eine Erniedrigung des LL im Plasma einen entscheidenden Faktor bei gewissen Krankheiten und auch im Alter dar. Diese Vorgänge im Fettstoffwechsel zu untersuchen und endgültig aufzuklären, ist weiteren Untersuchungen vorbehalten.

Wenn man die am schnellsten wandernde Zone betrachtet, kann man in Übereinstimmung mit anderen Autoren annehmen (8, 1o, 13, 34), daß der wesentliche Bestandteil dieser Fraktion die "Phosphatidsäuren" sind. Bei diesen Untersuchungen erwies sich eine geringe Abnahme der "Phosphatidsäuren" im Alter. In Anbetracht der Unklarheiten, die jedoch über diese Fraktion herrschen, wird für die Abnahme im Alter keine Erklärung abgegeben.

Keine Alters- und Geschlechtsunterschiede wiesen die Fraktionen LE, PI und PS auf.

Zusammenfassung:

1. Methodische Vorversuche wurden durchgeführt mit folgenden Veränderungen:
   a) Laufmittel
   b) Waschen des Extraktes
   c) Trägermedien: aa) nicht vorgewaschen
   bb) vorgewaschen

2. Die Plasmaphospholipide von je 15 stoffwechselnormalen Männern und Frauen der drei Altersgruppen
   Gruppe I 18 - 26 Jahre
   Gruppe II 39 - 54 Jahre
   Gruppe III 56 - 85 Jahre
   wurden dünnschichtchromatographisch getrennt und quantitativ bestimmt.

3. Lysolecithin und Phosphatidsäuren nehmen mit fortschreitendem Alter relativ und teilweise auch absolut ab.

4. Es zeigten sich keine nennenswerten Unterschiede bei den Fraktionen SP, LE, PI und PE.

5. Man konnte keine geschlechtsbedingten Unterschiede nachweisen.

Es ist mir vornehmste Pflicht, Herrn Professor Dr. H. B r a u n s t e i n e r , Medizinische Universitätsklinik Innsbruck, für die Überlassung des Themas und seine großzügige Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit auch an dieser Stelle herzlichst zu danken.

Mein aufrichtiger Dank gilt ebenfalls Herrn Professor Dr. H. F r a n k e, Medizinische Poliklinik Würzburg, der so freundlich war, das Korreferat zu übernehmen.

Herrn Dr. F. D i e n s t l und Herrn Dr. F. K u n z , beide Medizinische Universitätsklinik Innsbruck, danke ich sehr für die vielen Hinweise und Ratschläge, die zum Gelingen der Arbeit ebenfalls beitrugen.

L i t e r a t u r a n g a b e n :

1 Lea, C.H., D.N. Rhodes and R.D. Stoll: Chromatographic separation of phospholipids. Biochem. J. 60, 353, (1955)

2 Marinetti, G.V. and E. Stotz: Chromatography of phosphatides in silic acid-impregnated paper. Biochim. Biophys. Acta 21, 168, (1956)

3 Stahl, E., G. Schröter, G. Kraft und R. Renz: Dünnschichtchromatographie (Methode, Einflußfaktoren und einige Anwendungsbeispiele). Die Pharmazie 11, 633, (1956)

4 Phillips, G.B.: The lipid composition or serum in patients with liver disease. J. Clin. Invest. 39, 1639 - 1654, (1960)

5 Billimoria, J.D., V.J. Irani and N.F. Maclagan: Blood lipid fractionation and blood clotting in ischaemic heart disease. J. of Atherosclerosis Research 5, 102 - 111, (1965)

6 Folch, J., M. Lees and Sloane Stanley, G.H.: A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J. biol. Chem. 226, 497 - 509, (1957)

7 Carlson, L.A.: Determination of serum triglycerides. J. of Atheroscler. Res. 3, 334 - 336, (1963)

8 Christian, J.C., S. Jakorcic and Yi-Yung Hsia, D.: Thin-layer chromatographic analysis of plasma phospholipids in essential familial hyperlipidemia. J. Lab. and Clin. Med. 64, 756 - 762, (1964)

9 Bartlett, G.R.: Phosphorus assay in column chromatography. J. Biol. Chem. 234, 466 - 468, (1959)

10 Dienstl, F., F. Kunz und H.A. Maizar: Veränderungen der Plasmaphospholipide bei akuter Hepatitis. Klinische Wochen-

schrift 44, 967 - 968 (1966)

11 Skipski, P., R.F. Peterson and Marion Barclay: Quantitative analysis of phospholipids by thin-layer chromatography. Biochem. J. 90, 374, (1964)

12 Parker, F. and N.F. Petterson: Quantitative analysis of phospholipids and phospholipid fatty acids from silica gel thin-layer chromatogram. J. Lip. Res. 6, 455, (1965)

13 Skidmore, W.D. and C. Entenman: Two-dimensional thin-layer chromatography of rat liver phosphatides. J. Lipid Res. 3, 471 - 473, (1962)

14 Fisher, R.A.: Statistical methods for research workers. Oliver and Boyd, tenth edition 1946

15 Fisher, R,A. and YatesF.: Statistical tables for biological, agricultural and medical research. Oiver and Boyd, third edition 1948

16 Marinetti, G.V., M. Albrecht, T. Ford and Elmer Stotz: Analysis of human plasma phosphatides by paper chromatography. Biochimica et Biophysika Acta Vol 36, 4, (1959)

17 Nye, W.H.R., Ch. Waterhouse and G.V. Marinetti: The phosphatides of human plasma I. Normal values determined by paper- and column chromatography. J. clin. Invest. 40, 1194 - 1201, (1961)

18 Habermann, E., G. Bandtlow und B. Krusche: Bestimmung von Plasma-Phospholipiden nach Dünnschichtchromatographie. Kl. W Wschr. 39, 816, (1961)

19 Robinson, N. and B.M. Phillips: Quantitative thin layer chromatography of serum lipids. Clin. Chim. Acta 8, 385 - 392, (1963)

20 Wagener, H., D. Lang und B. Frosch: Dünnschichtchromatographische Untersuchungen über die Phosphatide des Blutserums Gesunder und Arteriosklerosekranker. Zeitschrift für gesamte experimentelle Medizin 138, 425, (1964)

21 Vikrot, O.: Quantitative determination of plasma phospholipids in pregnant and nonpregnant women, with special reference to lysolecithin. Acta Medica Scandinavica Vol. 175, fasc. 4, (1965)

22 Billimoria, J.D., V.J. Irani and N.F. Maclagan: Phospholipid fractionation and blood clotting. J. Atheroscler. Res., 5, 90 - 101, (1965)

23 Gjone, E. and O.M. Orning: Plasma phospholipids in patients with liver disease. A quantitative thin-layer chromatographic study. Scand. J. of Clinical a. Lab. Invest., Vol 18, no. 2, (1966)

24 Gloster, J. and R.F. Fletcher: Quantitative analysis of serum lipids with thin-layer chromatography. Clin. Chim. Acta 13, 235 - 240, (1966)

25 Montfoort, A., R.W.R. Baker, R.H.S. Thompson and K.J. Zikla: Plasma phospholipids and their fatty acid composition in multiple scerosis. J. Neurol. Neurosurg. Psychiat., 29, 99, (1966)

26 Jeannet, M. et P. Zahler: Analyse quantitative des principaux phospholipides plasmatiques dans l'anémie des affections malignes. Schweizerische Medizinische Wochenschrift Nr. 33, Bd. 96, 1070 - 1074, (1966)

27 Zöllner, N., G. Wolfram, W. Londong und K. Kirsch: Untersuchungen über die Plasmalipoide des Neugeborenen, Säuglings und Kleinkindes. Kl. Wschr. 44, 380 - 386, (1966)

28 Notham, M.M. und S. Proger: Kephaline im Blut Gesunder und an Atherosklerose der Kranzarterien Erkrankter. Die Medizinische Welt 4, 19o, (1965)

29 Axelrod, J., J. Reichenthal and B.B. Brodie: The direct determination of phosphatidylethanolamine and phosphatidylserine in plasma and red blood cells. J. biol. Chem. 2o4, 9o3, (1953)

3o Braunsteiner, H., S. Sailer, F. Sandhofer, R. Di Pauli, F. Gabl und A, Jung: Lipidwerte bei gesunden Personen und Patienten mit Myokardinfarkt. Wiener Klinische Wochenschrift 77, Heft 44/45, 859, (1965)

31 Hanahan, D.J., M. Rodbell and L.D. Turner: Enzymatic formation of monopalmitoleyl- and monopalmitoyllecithin (Lysolecithins). J. Biol. Chem. 2o6, 431, (1954)

32 Marples, E.A. and R.H.S. Thompson: The distribution of phospholipase B in mammalian tissues. Biochem. J. 74, 123, (196o)

33 Glomset, J.A., E.T. Janssen, R. Kennedy and J. Dobbins: Role of plasma Lecithin: Cholesterol Acyl-transferase in the metabolsim of high density lipoproteins. J. of Lipid Res. 7, No. 5, 639, (1966)

34 Biezenski, J.J.: Quantitation and preparation of phospholipids by elution following improved thin layer chromatography separation. Fed. Proc. 23, 5o3 - 5o5, (1964)

Abkürzungen:

LL Lysolecithin

SP Sphingomyelin

LE Lecithin

PI Phosphatidylinositol

PE Phosphatidyläthanolamin

PA Phosphatidsäuren

PS Phosphatidylserin

Lebenslauf

Am 21. Oktober 1943 wurde ich, Marita Elisabeth Heller, als erstes Kind des Facharztes für Chirurgie Dr. Hans Heller und seiner Ehefrau Adeline, geb. Mallmann, in Lüdenscheid/Westfalen geboren. Von 1949 - 1953 besuchte ich die Volksschulen in Altenmarkt und Osterhofen / Kreis Vilshofen. Im Herbst 1953 trat ich in das Realgymnasium der Ursulinen in Straubing ein. 1956 wechselte ich auf die Oberrealschule in Deggendorf, wo ich 1962 die Reifeprüfung ablegte. Im Wintersemester 1962/63 begann ich das Studium der Medizin an der Universität Würzburg, wo ich 1965 die ärztliche Vorprüfung bestand. Im klinischen Teil des Studiums belegte ich je drei Semester an den Universitäten Innsbruck und Würzburg. An letzterer Universität habe ich am 25. Juli 1968 die ärztliche Prüfung abgelegt.

Ich versichere ehrenwörtlich, daß ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfaßt und außer der angegebenen Literatur keine weiteren Hilfsquellen benutzt habe.

Ich versichere ehrenwörtlich, daß ich bisher von keiner anderen Seite ein Dissertationsthema zur endgültigen Bearbeitung erhalten habe.

Marita Heller

Offset-Druck Gugel, Würzburg
Burkarderstraße 9